

Afd. Akkerbouw 1982-10-25
VERSLAG 82.85 Pr.nr. 505.3010
Onderwerp: Bepaling van het gehalte aan
fytosterolen in botervet.
Voorgaande verslag: 81.97.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.
Akkerbouw (4x), afd. Normalisatie (Humme), Oortwijn,
Projektadministratie, Projektleider (Muuse).

Project: Ontwikkeling methoden voor het bepalen van de vetzuur en/of sterolsamenstelling in landbouw- en visserijprodukten

Onderwerp: Bepaling van het gehalte aan fytosterolen in botervet.

Voorgaand verslag: 81.97

Doel:

Verbetering van de analysemethodiek voor de bepaling van het gehalte aan steroltracers in EEG boter.

Samenvatting:

Aan een botervet werd een bekende hoeveelheid stigma- respectievelijk sitosterol toegevoegd overeenkomstig de EEG-regeling. De zuiverheid van deze tracers werd gaschromatografisch vastgesteld via een interne standaard.

Uit het monster botervet en de monsters botervet met toevoegingen werden volgens de huidige methode de sterolen geïsoleerd door ze neer te slaan met digitonine (volgens NEN 6350). Om te onderzoeken of alle sterolen neergeslagen werden, werd uit het filtraat het onverzeepbare deel geëxtraheerd en onderzocht op sterolen (enzymatisch) en sterolsamenstelling.

De sterolsamenstellingen werden vastgesteld, middels capillaire gaschromatografie.

Daar vooral de stigmasterol tracer niet teruggevonden werd en bovendien een grote spreiding in de analyse gevonden werd, medeveroorzaakt door discriminatie van stigmasterol t.o.v. cholesterol bij het neerslaan met digitonine, werd besloten de sterolsamenstelling te bepalen via het onverzeepbare deel al dan niet na dunnelaagscheiding.



Tenslotte is de spreiding van de gaschromatografische analyse onderzocht.

Met massaspectrometrie werd de structuur bepaald van de component die met capillair GC naast β -sitosterol werd gevonden.

Conclusie:

Voor botervetten getraceerd met stigmasterol dient het sterolgehalte bepaald te worden volgens NEN 6350. De sterolsamenstelling moet via het onverzeepbare deel eventueel gevolgd door een dunnelaagscheiding vastgesteld worden, daar stigmasterol onvollediger dan cholesterol neergeslagen wordt met digitonine.

Voor botervetten getraceerd met sitosterol kan het sitosterolgehalte vastgesteld worden door het totaalsterolgehalte te bepalen volgens NEN 6350 en vervolgens de sterolsamenstelling te bepalen na vrijmaking van de sterolen uit de digitoniden (fout circa 3%), overeenkomstig de huidige methode. Deze sterolsamenstelling kan echter ook bepaald worden via het onverzeepbare deel voor β -sitosterol. Voor sitosterol (som van stigmastanol en β -sitosterol) is fraktionering van het onverzeepbare deel via dunnelaagchromatografie noodzakelijk. Capillaire gaschromatografie maakt onderscheid tussen β -sitosterol en andere sterolen zoals stigmastanol. Stigmastanol bleek een aanmerkelijk deel uit te maken van de sitosteroltracer. Aan de in de verordening opgenomen zuiverheidseis van tenminste 80% β -sitosterol werd niet voldaan.

Verantwoordelijk: drs B.G. Muuse 
Medewerker/Samensteller: H.J. van der Kamp
Projectleider: drs B.G. Muuse 

Met dank aan Tuinstra en Traag voor het GC-MS onderzoek.

Inhoudsopgave

1. Inleiding
2. Methoden
3. Onderzoek
 - 3.1 Toevoeging tracers aan een botervet
 - 3.2 Onderzoek van de huidige methode (digitonide methode)
 - 3.3 Sterolsamenstelling via het onverzeepbare deel
 - 3.4 Controle van de methode met behulp van cholestaan als interne standard
 - 3.5 Spreiding GCC analyse
4. Discussie
 - 4.1 Overzichtstabel met de belangrijkste resultaten
 - 4.2 Bespreking van de resultaten
 - 4.2.1 Het totaal sterolgehalte
 - 4.2.2 Het sterolgehalte en samenstelling van het filtraat bij NEN 6350
 - 4.2.3 Sterolsamenstelling via het onverzeepbare deel
 - 4.2.4 Recovery
 - 4.2.5 Spreiding in de G.C.C. analyse en gevolgde methode
 - 4.2.6 Opsplitsing van sitosterol in β sitosterol en stigmastanol
5. Conclusie
6. Aanbevelingen voor verder onderzoek
7. Literatuur

1. Inleiding:

Bij de controle op de hoeveelheden tracers stigmasterol resp. sitosterol, die toegevoegd moeten worden aan botervetten die vallen onder EEG verordening 262/79 worden nog steeds regelmatig te lage gehalten gevonden, ondanks de verscherpte analyse-omstandigheden, zoals vermeld in intern verslag 81.97.

Om na te gaan op welke onderdelen de huidige methode verbetering behoeft, werd dit onderzoek gestart, waarbij vooral gelet werd op de kritische stappen in de methoden en waar mogelijk, werden alternatieve methoden toegepast.

Aan een monster botervet werd een bekende hoeveelheid stigma- resp. sitosterol toegevoegd waarvan de zuiverheid was bepaald via een interne standaard. Uit deze monsters werden de sterolen gravimetrisch geïsoleerd door ze neer te slaan met digitonine. Uit het filtraat werd het onverzeepbare deel geëxtraheerd, om te onderzoeken of alle sterolen neergeslagen werden. Dit bleek niet het geval en er trad bovendien discriminatie op bij het neerslaan van stigmasterol ten opzichte van cholesterol. De sterolsamenstelling moest derhalve bepaald worden via het onverzeepbare deel, eventueel na DLC voorscheiding.

Deze laatste methode werd gecontroleerd met een interne standaard (cholestaan). Tenslotte werd de spreiding van de GCC analyse onderzocht. In dit onderzoek werd gebruik gemaakt van capillaire gaschromatografie waarbij aanzienlijk betere scheidingen worden verkregen dan met gepakte kolommen. Hierbij bleek dat de sitosterolpiek bestond uit 2 componenten die met behulp van GC-MS werden geïdentificeerd als β -sitosterol en vermoedelijk stigmastanol (zie ook opmerking bij 3.1).

2. Methoden:

Bepaling totaal sterolgehalte:

Enzymatisch: Boehringer-methode - Cholesterol.

Digitonine methode volgens:

NEN 6350 - Bepaling van het totaal sterolgehalte.

Onverzeepbare deel:

NEN 1046 : Plantaardige en dierlijke oliën en vetten, onderzoeksmethoden.

Dunnelaag fraktionering van het onverzeepbare deel: Ontwerp NEN 6364.
Gaschromatografische analyse: Capillair GC sterolen - interne methode
akkerbouw.

3. Onderzoek:

3.1 Toevoeging tracers aan een botervet

Aan een botervet werd een bekende hoeveelheid stigma- respektievelijk sitosterol toegevoegd.

De zuiverheid van de toegevoegde tracers werd gaschromatografisch bepaald met behulp van cholesterol als interne standaard.

Resultaat: stigmasterol: 86,71% s = 0,46
 sitosterol : 85,72% s = 0,92
 β -sitosterol: 67,95%.

Uit deze resultaten is de toevoeging aan het botervet berekend.

Toevoeging: stigmasterol 142 mg/kg botervet
 sitosterol 503 mg/kg botervet
 β -sitosterol 399 mg/kg botervet.

Opmerking:

1. Onder sitosterol wordt in dit verslag verstaan de componenten die bij dit onderzoek werden aangemerkt met β -sitosterol en stigmastanol tezamen. Middels GC-MS onderzoek werd de structuur vastgesteld.
2. Bij gebruik van de interne standaard cholesterol is rekening gehouden met de GC zuiverheid. Daarbij is aangenomen dat cholesterol vrij is van niet elueerbare bestanddelen en eenzelfde responsfaktor heeft als stigma- en sitosterol.

3.2 Onderzoek van de huidige methode (digitonide methode)

a. Sterolgehalte: Van de boven bereide monsters werden zowel enzymatisch als gravimetrisch de sterolgehalten bepaald.

b. Sterolgehalte van het filtraat bij NEN 6350

De sterolen werden conform NEN 6350 na verzeeping neergeslagen met digitonine in een alcohol-watermilieu. De steroldigitoniden werden afgefiltreerd. De filtraten werden opgevangen en ingedampt om de overmaat alcohol te verwijderen. Hieruit werd het onverzeepbare deel verkregen door extractie met diethylether conform NEN 1046.

In dit onverzeepbare deel werd in een aantal gevallen enzymatisch het gehalte aan sterolen bepaald. Het restant van het onverzeepbare deel werd opgelost in een 1% digitonine-oplossing in ethanol (ca. 10 ml) onder verwarmen. Na toevoeging van enkele druppels water slaan de digitoniden neer, die daarna konden worden afgefiltreerd. Uit de steroldigitoniden verkregen bij a. via NEN 6350 en bij b. uit het filtraat werden de sterolen vrijgemaakt en geanalyseerd met gaschromatografie (capillair).

De resultaten staan vermeld in Tabel I.

Tabel I

	Botervet						Botervet + sitosterol (503 mg) ¹ (399 mg) ²						Botervet + stigmasterol (142 mg/kg)					
	Gem.						Gem.						Gem.					
Totaal St. gehalte Enzymatisch (%)						0,275						0,327						0,295
Digitonide (%)	0,281	0,281	0,287	0,285	0,285	0,284	0,340	0,337	0,341	0,341	0,327	0,337	0,300	0,300	0,294	0,302	0,299	0,299
GOC samenstelling sterolen uit de digitoniden (analyse in duplo) + berekende toevoegingen en recoveries																		
Cholesterol	97,37	97,63	98,29	97,43	98,45	97,83	82,72	83,48	82,77	83,41	82,20		93,11	93,56	93,26	93,13	93,79	
Campesterol							1,15	0,93	1,16	1,18	1,52		0,44	0,39	0,65	0,36	0,51	
Stigmasterol													4,26	4,33	4,35	4,09	4,09	
β -sitosterol							11,73	11,83	11,78	11,36	11,67		0,39	0,33	0,41	0,22	0,33	
Stigmastanol							3,14	2,92	2,98	3,12	3,59		0,32	0,21	0,23	0,32	0,21	
Toevoeging als sito cq. stigmasterol							506	497	503	494	499		128	130	128	124	122	
β -sitosterol							398	399	402	387	382							
Recovery sito cq. stig- masterol							100,6	98,8	100,0	98,2	99,2		90,1	91,5	90,1	87,3	85,9	
β -sitosterol							99,7	100,0	100,8	97,0	95,7							
Cholesterol							81,19	81,74	81,39	82,05	82,42	82,24	92,93	92,37	92,86	92,93	93,34	93,13
Campesterol							1,75	1,49	1,66	1,60	1,68	1,41	0,49	0,56	0,54	0,52	0,48	0,49
Stigmasterol							0,15	0,15	0,11	0,03	0,11	0,03	4,05	4,41	4,09	4,12	4,34	4,21
β -sitosterol							12,05	12,08	11,97	12,11	12,14	11,87	0,36	0,38	0,36	0,31	0,44	0,35
Stigmastanol							3,18	3,12	3,20	3,23	3,07	3,16	0,21	0,30	0,22	0,17	0,17	0,24
Toevoeging als sito cq. stigmasterol							518	512	517	523	497	507	122	132	120	124	130	126
β -sitosterol							410	407	408	413	397	400						
Recovery sito cq. stig- masterol							103,0	101,8	102,8	104,0	98,8	100,7	85,9	93,0	84,5	87,3	91,5	88,7
β -sitosterol							102,8	102,0	102,3	103,5	99,5	100,3						
GOC samenstelling sterolen uit het filtraat + berekende toevoegingen en recoveries + sterolgehalte																		
Sterolgehalte filtraat enzymatisch (%)		0,012	0,011				0,011	0,012	0,011						0,011	0,011	0,011	
Cholesterol							85,13	81,48	83,68	82,70	82,50	83,10			85,24	85,90	84,40	85,18
Campesterol							1,84	2,18	2,07	1,37	2,05	1,90			1,44	0,71	1,09	1,08
Stigmasterol									0,13		0,26	0,08			8,09	9,57	9,48	9,05
β -sitosterol							9,13	10,77	9,98	10,09	11,17	10,23			2,80	1,27	1,72	1,93
Stigmastanol							3,08	4,40	3,29	3,62	3,29	3,54			1,72	1,80	1,72	1,75
Toevoeging (berekend op 0,011%) als sito cq. stigmasterol							415	511	453	468	473	464			238	289	282	270
Totale toevoeging							13	17	15	15	16	15			9	11	10	10
Totale recovery							525	521	525	523	514	522			133	135	136	135
Toevoeging als β -sito- sterol							104,4	103,6	104,4	104,0	102,2	103,8			93,7	95,1	95,8	95,1
Totale toevoeging							10	13	11	11	12	11						
Totale recovery							414	416	416	411	402	412						
Totale recovery							103,8	104,3	104,3	103,0	100,8	103,3						

1) Toevoeging aan sitosterol (= β -sito + stigmastanol)2) Toevoeging aan β -sitosterol

cholesterol	85,13	81,48	83,68	82,70	82,50	83,10	85,24	85,90	84,40	85,11
Campesterol	1,84	2,18	2,07	1,37	2,05	1,90	1,44	0,71	1,09	1,08
Stigmasterol			0,13		0,26	0,08	8,09	9,57	9,48	9,05
β -sitosterol	9,13	10,77	9,98	10,09	11,17	10,23	2,80	1,27	1,72	1,93
Stigmastanol	3,08	4,40	3,29	3,62	3,29	3,54	1,72	1,80	1,72	1,75
Toevoeging (berekend op 0,011%) als sito cq. stigmasterol	415	511	453	468	473	464	238	289	282	270
Totale toevoeging	13	17	15	15	16	15	9	11	10	10
Totale recovery	525	521	525	523	514	522	133	135	136	135
Toevoeging als β -sitosterol	104,4	103,6	104,4	104,0	102,2	103,8	93,7	95,1	95,8	95,1
Totale toevoeging	10	13	11	11	12	11				
Totale recovery	414	416	416	411	402	412				
	103,8	104,3	104,3	103,0	100,8	103,3				

1) Toevoeging aan sitosterol (= β -sito + stigmastanol)

2) Toevoeging aan β -sitosterol

Tabel I

	Botervet						Botervet + sitosterol (503 mg) ¹ (399 mg) ²						Botervet + stigmasterol (142 mg/kg)					
	Gem.						Gem.						Gem.					
Totaal St.gehalte																		
Enzymatisch (%)						0,275						0,327						0,295
Digitonide (%)	0,281	0,281	0,287	0,285	0,285	0,284	0,340	0,337	0,341	0,341	0,327	0,337	0,300	0,300	0,294	0,302	0,299	0,299
GCC samenstelling sterolen uit de digitoniden (analyse in duplo) + berekende toevoegingen en recoveries																		
Cholesterol	97,37	97,63	98,29	97,43	98,45	97,83	82,72	83,48	82,77	83,41	82,20		93,11	93,56	93,26	93,13	93,79	
Campesterol							1,15	0,93	1,16	1,18	1,52		0,44	0,39	0,65	0,36	0,51	
Stigmasterol													4,26	4,33	4,35	4,09	4,09	
β-sitosterol							11,73	11,83	11,78	11,36	11,67		0,39	0,33	0,41	0,22	0,33	
Stigmastanol							3,14	2,92	2,98	3,12	3,59		0,32	0,21	0,23	0,32	0,21	
Toevoeging als sito cq. stigmasterol							506	497	503	494	499		128	130	128	124	122	
β-sitosterol							398	399	402	387	382							
Recovery sito cq. stigmasterol							100,6	98,8	100,0	98,2	99,2		90,1	91,5	90,1	87,3	85,9	
β-sitosterol							99,7	100,0	100,8	97,0	95,7							
Cholesterol							81,19	81,74	81,39	82,05	82,42	82,24	92,93	92,37	92,86	92,93	93,34	93,13
Campesterol							1,75	1,49	1,66	1,60	1,68	1,41	0,49	0,56	0,54	0,52	0,48	0,49
Stigmasterol							0,15				0,11	0,03	4,05	4,41	4,09	4,12	4,34	4,21
β-sitosterol							12,05	12,08	11,97	12,11	12,14	11,87	0,36	0,38	0,36	0,31	0,44	0,35
Stigmastanol							3,18	3,12	3,20	3,23	3,07	3,16	0,21	0,30	0,22	0,17	0,17	0,24
Toevoeging als sito cq. stigmasterol							518	512	517	523	497	507	122	132	120	124	130	126
β-sitosterol							410	407	408	413	397	400						
Recovery sito cq. stigmasterol							103,0	101,8	102,8	104,0	98,8	100,7	85,9	93,0	84,5	87,3	91,5	88,7
β-sitosterol							102,8	102,0	102,3	103,5	99,5	100,3						
GCC samenstelling sterolen uit het filtraat + berekende toevoegingen en recoveries + sterolgehalte																		
Sterolgehalte filtraat enzymatisch (%)		0,012	0,011				0,011	0,012	0,011						0,011	0,011	0,011	

3.3 Sterolsamenstelling via het onverzeepbare deel:

Uit tabel I bleek dat stigmasterol minder goed werd neergeslagen dan cholesterol en dat in het filtraat van het digitonideneerslag nog sterolen aanwezig waren.

Om deze problemen te omzeilen, werd uit het botervet en het botervet met toevoegingen, het onverzeepbare deel geïsoleerd volgens NEN 1046, hetgeen rechtstreeks doch ook na fraktionering met DLC na oplossen in diethylether werd geanalyseerd met GCC.

Voor het berekenen van de toevoeging werd het gemiddeld sterolgehalte gebruikt, gevonden bij de digitonidebepaling (zie tabel I). De resultaten staan vermeld in tabel II.

Tabel II

	GCC samenstelling onverzeepbaar									
	Botervet		Botervet + sitosterol				Botervet + stigmasterol			
Cholesterol	95,73	96,04	78,31	80,62	80,39		91,09	91,15	90,84	
Campesterol	0,74	0,39	1,78	1,60	1,55		0,62	0,53	0,59	
Stigmasterol			1,40		0,13		4,57	4,53	4,45	
β -sitosterol			11,80	11,63	11,90		0,27	0,24	0,24	
Stigmastanol + stoorpiek	1,82	1,84	4,65	4,89	4,72		1,92	1,96	2,04	
Toevoeging als sito cq. stigmasterol			554	557	560	557	137	135	133	135
β -sito			398	392	401	397				
Recovery sito cq. stigma			110,2	110,7	111,3	110,7	96,5	95,1	93,7	95,1
β -sito			99,7	98,2	100,5	99,5				
	GCC samenstelling onverzeepbaar na DLC (analyse in duplo)									
Cholesterol	98,14	97,67	82,64	82,35	81,93		92,22	93,25	93,45	
Campesterol	0,23	0,31	1,23	1,53	1,29		0,51	0,40	0,28	
Stigmasterol							4,72	4,28	4,42	
β -sitosterol	0,28	0,14	11,96	11,65	12,21		0,56	0,57	0,41	
Stigmastanol	0,17	0,07	3,05	3,20	3,09				0,08	
Toevoeging als sito cq. stigmasterol			506	500	516		141	128	132	
β -sito			403	393	411					
Recovery sito cq. stigmasterol			100,6	99,4	102,6		99,3	90,1	93,0	
β -sito			101,0	98,5	103,0					
Cholesterol			81,23	82,48	82,31		93,06	93,52	92,78	
Campesterol			1,61	1,33	1,14		0,42	0,29	0,41	
Stigmasterol			0,12				4,58	4,30	4,74	
β -sitosterol			11,93	11,67	11,94		0,61	0,44	0,54	
Stigmastanol			3,39	3,04	3,14			0,11	0,12	
Toevoeging als sito cq. stigmasterol			516	496	508	507	137	129	142	135
β -sito			402	393	402	401				
Recovery sito cq. stigmasterol			102,6	98,6	101,0	100,8	96,5	90,8	100,0	95,1
β -sito			100,8	98,5	100,8	100,5				

3.4 Controle van de methode met behulp van cholestaan als interne standaard

De bepaling van het tracergehalte via het onverzeepbaar (3.3) werd gecontroleerd met cholestaan als interne standaard.

Hiertoe werd eerst de responsfaktor van cholestaan ten opzichte van de toegevoegde tracer stigmasterol resp. β -sitosterol bepaald. Vervolgens werd aan het botervet met stigma- resp. β -sitosterol een bepaalde hoeveelheid cholestaan toegevoegd waarna het onverzeepbare deel werd geextraheerd volgens NEN 1046, hetgeen na oplossen rechtstreeks werd geanalyseerd met GCC, waarna de toevoeging aan sigma resp. β -sitosterol werd berekend.

Resultaat: Recovery stigmasterol: 100,2%
 β sitosterol: 98,0%.

Opmerking: Op deze manier is de recovery van de gebruikte methode te controleren, doch zegt nog niets over het absolute niveau. Daar zijn nl. zeer zuivere standaarden voor nodig om de responsfaktor van cholestaan ten opzichte van stigma resp. β -sitosterol te bepalen.

3.5 Spreiding GCC analyse

Er werd een mengmonster cholesterol-stigmasterol en een mengmonster cholesterol-sitosterol gemaakt. Deze werden opgelost in diethylether en op verschillende dagen enkele keren geanalyseerd met behulp van GCC, om zodoende de spreiding van de analyse vast te stellen.

Resultaat:

Voor stigmasterol-cholesterol:

n = 16 cholesterol : 90,29% s = 0,20 rel.st.afw. = 0,22
stigmasterol: 4,62% s = 0,09 rel.st.afw. = 1,95.

Voor sitosterol-cholesterol:

n = 14 cholesterol : 83,60% s = 0,16 rel.st.afw. = 0,19
sitosterol : 11,87% s = 0,09 rel.st.afw. = 0,76.

Dit houdt in dat voor stigmasterol een spreiding in het gehalte wordt gevonden van twee keer de relatieve standaardafwijking hetgeen neerkomt op 3,9% (waarschijnlijkheid van 95%) en voor sitosterol een spreiding van 1,52%.

4. Diskussie:

4.1 Overzichtstabel met de belangrijkste resultaten.

Tabel III

	BV + sitosterol		BV + β -sitosterol		BV + stigmasterol	
	Digitonide	Direct via onverzeepbaar	Digitonide	Direct via onverzeepbaar	Digitonide	Direct via onverzeepbaar
Sterolgehalte:						
Enzymatisch %	0,327		0,327		0,295	
Digitonide %	0,337		0,337		0,299	
Tracergehalte %	15,03	16,53	11,87	11,78	4,21	4,52
Toevoeging mg/100 g	507	557	400	397	126	135
Recovery %	100,7	110,7	100,3	99,5	88,7	95,1
	Filtraat	Na DLC	Filtraat	Na DLC	Filtraat	Na DLC
Sterolgehalte %	0,011		0,011		0,011	
Tracergehalte %	13,77	15,05	10,23	11,89	9,05	4,51
Toevoeging mg/100 g	15	507	11	401	10	135
Recovery	3,0	100,8	2,8	100,5	7,0	95,1
Totale recovery %	103,8		103,0		95,8	

_____ = niet acceptabel resultaat.

4.2 Bespreking van de resultaten:

4.2.1 Het totaal sterolgehalte (3.2.1)

De sterolgehalten van het botervet en botervet met toevoegingen, gevonden via de digitonide-methode (NEN 6350) en enzymatische analyse, komen vrij goed met elkaar overeen.

De enzymatisch gevonden sterolgehalten zijn iets lager (0,004-0,010%). Wel dient opgemerkt te worden dat in het filtraat van de digitonide-methode nog sterolen zijn aangetoond (ca. 0,011%) zodat het verschil iets groter zal zijn.

4.2.2 Het sterolgehalte en samenstelling van het filtraat bij NEN 6350 (3.2.2)

Sterolen worden met digitonine volgens NEN 6350 niet kwantitatief neergeslagen. In het filtraat werd nog ca. 4% van de sterolen gevonden. Bovendien geldt voor het met stigmasterol getraceerde botervet dat de uit het filtraat geïsoleerde sterolen twee keer zo veel stigmasterol bevatten als de sterolen uit het overeenkomstige digitonideneerslag (resp. gem. 9,05 en 4,21%). Hieruit blijkt dat stigmasterol minder neerslaat met digitonine dan cholesterol.

Voor het met sitosterol getraceerde botervet geldt dat er nagenoeg geen verschil in sterolsamenstelling werd gevonden tussen de sterolen uit het filtraat en de sterolen uit het overeenkomstig digitonide neerslag.

Het vermoeden bestaat dat het verschillend gedrag van de steroldigitoniden veroorzaakt wordt door hun verschillende oplosbaarheidsproducten. Dit kan tevens een verklaring zijn voor de spreiding in de resultaten. De mate van oplosbaarheid zal afhangen van temperatuur en hoeveelheid van de moederloog en wasvloeistof. Deze omstandigheden werden in deze fase van het onderzoek niet extreem gestandaardiseerd.

4.2.3 Sterolsamenstelling via het onverzeepbare deel (3.3)

In het onverzeepbare deel van botervet zit een component die stoort bij rechtstreekse insputting van het onverzeepbaar op de GC.

Deze piek valt samen met stigmastanol en vertegenwoordigt ca. 2%. Dit houdt in dat voor de bepaling van het sitosterolgehalte (gepakte kolommen) het onverzeepbaar eerst via DLC gescheiden moet worden in de verschillende frakties.

Na DLC is deze piek namelijk niet meer aanwezig in de sterolfractie. Stigmastanol en β -sitosterol (GCC) lijken wat dat betreft geen moeilijkheden te geven en zouden wel bepaald kunnen worden in het onverzeepbaar rekening houdend met de stoorpiek.

Deze methode is gecheckt met cholestaan als interne standaard (zie 3.4) voor stigma- en β -sitosterol (recovery 100,2 en 98,0%).

Deze methode is dus goed bruikbaar.

4.2.4 Recovery

4.2.4.1 β -sitosterol (GCC) en sitosterol (gepakte kolommen) kunnen bepaald worden via NEN 6350 (fout ca. 3%), maar ook via het onverzeepbare deel. Voor sitosterol (som van β -sitosterol en stigmastanol) is echter fraktionering middels DLC noodzakelijk vanwege een stoorpiek die samenvalt met stigmastanol.

De recoveries van β -sito en sitosterol waren resp. 100,3 en 100,7% via NEN 6350 en via het onverzeepbaar al dan niet na DLC 100,5 en 100,8%. Als de in het filtraat gevonden sterolen erbij geteld worden wordt de recovery voor de digitoniden resp. 103,0 en 103,8%.

4.2.4.2 Stigmasterol kan alleen bepaald worden via het onverzeepbare deel, daar bij het neerslaan met digitonine een discriminatie ontstaat. Zowel voor als na DLC wordt 95,1% teruggevonden via het onverzeepbare deel. De recovery gevonden via de digitonide komt goed overeen mits de in het filtraat gevonden sterolen erbij geteld worden (recovery is 95,1%).

Over de juistheid van de gevonden recoveries valt feitelijk nog niets te zeggen. Deze is namelijk afhankelijk van de zuiverheid van de toegevoegde tracers, de methode, het sterolgehalte en de respons factoren bij de gaschromatografische analyse. Gezien de gevonden recoveries en het gestelde in 3.4 kan gesteld worden dat de gevolgde methode goed is, terwijl ook het sterolgehalte bepaald via NEN 6350 en enzymatisch goed met elkaar overeenstemmen. Om de responsfactoren en de zuiverheid van de toegevoegde tracers te kunnen bepalen is het noodzakelijk zuivere stoffen te hebben.

4.2.5 Spreiding in de GCC analyse (3.5) en gevolgde methode:

Door de GCC analyse wordt een zekere spreiding veroorzaakt in de gevonden gehalten. Voor stigmasterol is deze spreiding 3,9% en voor sitosterol 1,5% van het gevonden gehalte met een waarschijnlijkheid van 95%.

Om zicht te krijgen op de spreiding in de methode is het nodig een groter aantal analyses te doen.

4.2.6 Opsplitsing van sitosterol in β sitosterol en stigmastanol

β -sitosterol kan alleen via capillaire gaschromatografie bepaald worden, daar op gepakte kolommen β -sitosterol samenvalt met andere sterolen zoals stigmastanol.

Uit dit onderzoek bleek dat de gebruikte sitosteroltracer niet voldeed aan de eisen gesteld in EEG verordening 262/79.

5. Conclusie

Het neerslaan van stigmasterol in botervet met digitonine levert problemen op daar stigmasterol selectief neerslaat ten opzichte van cholesterol en moet derhalve op een andere manier bepaald worden namelijk door rechtstreekse analyse van het onverzeepbare deel.

β -Sitosterol en sitosterol (som van β -sitosterol en stigmastanol) in botervet kunnen bepaald worden via NEN 6350 maar ook via het onverzeeptbaar. Voor sitosterol is fraktionering via DLC noodzakelijk. Het totaalsterolgehalte kan via NEN 6350 of enzymatisch bepaald worden. β -sitosterol kan alleen met behulp van capillaire gaschromatografie bepaald worden.

6. Aanbevelingen voor verder onderzoek

1. Om de juistheid van de gevonden recoveries te bewijzen is het noodzakelijk de zuiverheid van de toegevoegde tracers beter te bepalen danwel de responsfactoren van de verschillende sterolen vast te stellen.

Verder onderzoek naar de zuiverheid van de toegevoegde tracers is moeilijk doch geboden.

2. Om zicht te krijgen op de spreiding van de in dit verslag gevolgde methoden is het nodig om een groter aantal analyses te doen na uitwerking van 6.1.

7. Literatuur

1. 4-Demethyl-, 4 Monomethyl- and 4,4 Dimethylsterols in Some Vegetable Oils by A. Kornfeldt and L.B. Croon.
Lipids 16, no. 5, 306 (1981).
2. Les différentes méthodes de détermination de la composition stérolique et leur application à l'analyse des corps gras. F. Mordret, A. Prevot, J.P. Wolff.
Ann. Fals. Exp. Chim. 70, no. 750, 87 (1977).
3. Sterine und Methylsterine in Kakaobutter und Kakaobutter - Ersatzfetten durch E. Homberg, B. Bielefeld.
Deutsche Lebensmittel-Rundschau 78, Heft 3, 73 (1982).